

تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB39 در بیماران ناشنوای غیر سندرمی مغلوب اتوزومی استان خوزستان

نرگس زارع پور^۱، محمدامین طباطبایی فر^۲، افسانه تقی پور^۱، فاطمه نعمتی^۱، لادن صادقیان^۱، مرتضی هاشم زاده چالشتی^{۳*}

^۱دانشجو، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ ^۳مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۸

چکیده:

زمینه و هدف: ناشنوایی رایج ترین نقص حسی در انسان است و در حدود یک مورد از هر ۱۰۰۰ کودک دارای ناشنوایی شدید یا عمیق می باشند. حدود ۵۰٪ موارد ناشنوایی، ارثی است و تقریباً ۷۰٪ موارد ناشنوایی، غیر سندرمی است که حدود ۸۰٪ این نوع ناشنوایی به صورت مغلوب اتوزومی به ارث می رسد. این بیماری هتروژن می باشد و شیوع آن در کشورهای در حال توسعه بیشتر است. در ایران نیز به دلیل بالا بودن نرخ ازدواج های خویشاوندی، فراوانی بالایی دارد. هدف از این مطالعه تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB39 در خانواده هایی با ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی در استان خوزستان می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی، به منظور تعیین نوع و فراوانی جهش های ژن *HGF* ۳۰۰ فرد از ۲۵ خانواده با ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی از استان خوزستان بررسی شد. خانواده های انتخاب شده در این مطالعه، ازدواج خویشاوندی داشتند و دارای حداقل دو فرد ناشنوا بودند و همچنین از نظر جهش های ژن *GJB2* منفی بودند. تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی با انتخاب ۶ نشانگر STR (Short tandem repeats) داخلی یا نزدیک به لوکوس DFNB39 به وسیله PCR و ژل پلی آکرل آمید صورت گرفت.

یافته ها: پس از بررسی خانواده های مختلف، هیچ یک از خانواده ها با لوکوس DFNB39 پیوستگی نشان نداد. این مطالعه حاکی از آن است که جهش های ژن *HGF* در ایجاد ناشنوایی در خانواده های مورد بررسی احتمالاً نقشی ندارند. نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، لوکوس DFNB39 اهمیت چندانی در بروز ناشنوایی در جمعیت مورد مطالعه ندارد؛ ولی برای تعیین نقش دقیق تر این لوکوس در جمعیت ایرانی مطالعات بیشتر ضروری است.

واژه های کلیدی: لوکوس DFNB39، ژن *HGF*، ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی.

مقدمه:

بررسی های اپیدمیولوژیکی همواره نشان داده اند که حدود ۵۰٪ ناشنوایی های دوران کودکی به علل ژنتیکی مربوط می شوند (۱). ناشنوایی ارثی در ۲۵٪ موارد به صورت سندرمی (SHL) و در ۷۵٪ موارد به صورت غیر سندرمی یا NSHL (Non syndromic hearing loss) است. بر اساس سن شروع و شدت ناشنوایی، ناشنوایی

ناشنوایی رایج ترین نقص حسی در انسان است. ۱/۵۰۰ نوزادان دارای ناشنوایی حسی عصبی دائم دوطرفه می باشند که شیوع آن به ۲/۷ در ۱۰۰۰ در سن ۵ سالگی و ۳/۵ در ۱۰۰۰ در طول دوران بلوغ افزایش می یابد. این اختلال چندعاملی است که از طریق عوامل محیطی یا عوامل ژنتیکی و یا ترکیبی از این دو ایجاد می شود.

*نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- پژوهشکده علوم پایه سلامت- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی-

تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۳۱۴۷۱، E-mail mchalesh@yahoo.com

ارثی به انواع مادرزادی، پیش از تکلم، پس از تکلم و ملایم تا عمیق تقسیم‌بندی می‌شود. ۸۵٪-۷۵٪ موارد ناشنوایی غیر سندرمی به صورت مغلوب اتوزومی (ARNSHL) و ۲۵٪-۱۵٪ موارد به صورت غالب اتوزومی (ADNSHL) به ارث می‌رسند. حدود ۱٪ تا ۲٪ موارد نیز توارث میتوکندریایی و وابسته به X نشان می‌دهند (۳،۲). فنوتیپ بیماری در موارد مغلوب به مراتب شدیدتر و معمولاً دارای بروز پیش از تکلم است. با در نظر گرفتن پیچیدگی فرایند شنوایی می‌توان انتظار داشت که تعداد زیادی از ژن‌های انسان در این فرایند دخیل می‌باشند. تخمین‌ها حاکی از آن است که حدود ۱٪ ژن‌های انسان (۲۰۰ تا ۲۵۰ ژن) به نحوی در فرایند شنوایی دخیل می‌باشند. تا به امروز بیش از ۸۰ ژن، بیش از ۱۰۰ جهش و ۱۴۰ لوکوس برای همراهی با ناشنوایی غیر سندرمی شناسایی شده است (۴). به‌استثنای جهش‌های کمی که در ژن‌هایی نظیر *GJB2* و *SLC26A4* تاکنون شناخته شده است، اکثر جهش‌های ناشنوایی بی‌نهایت نادر هستند و در یک یا تعداد بسیار کمی از خانواده‌ها دیده شده‌اند (۵)؛ بنابراین ناشنوایی طیف گسترده‌ای از علل ژنتیکی، محیطی و ناشناخته دارد که نوع و سهم هریک از علل در اقوام و جمعیت‌های مختلف متفاوت است. در کشور ما مطالعات نسبتاً کمی بر روی ARNSHL انجام گرفته و بیشتر پژوهش‌ها به یک لوکوس خاص و به‌طور مشخص *DFNB1* که ژن *GJB2 (CX26)* را در بردارد، معطوف بوده است (۶). به‌طور میانگین در ایران تنها حدود ۱۸/۲۹٪ موارد ARNSHL به‌وسیله ژن *GJB2* ایجاد می‌شود (۷). جهش‌های *GJB2* در جمعیت شمال غربی ایران بیشترین شیوع (حدود ۴۰٪) را دارند و کمترین میزان شیوع آن‌ها (حدود ۲٪) به جمعیت خلیج فارس مربوط می‌شود. این یافته‌ها کاهش فراوانی ناشنوایی وابسته به جهش‌های *GJB2* از شمال غربی تا جنوب شرقی ایران را نشان می‌دهد (۹،۸). بر اساس نرخ بالای ازدواج خویشاوندی (۳۸/۶٪) در ایران می‌توان پیش‌بینی نمود که در ایران نسبت به جمعیت‌های اروپا و آمریکای

شمالی ARNSHL نسبت بالاتری در میان ناشنوایی‌های ژنتیکی غیر سندرمی دارد (۶). حدود ۴۵۰ هزار ناشنوا در ایران زندگی می‌کنند و سالانه حدود ۱۴۰۰ ناشنوی عمیق در کشور متولد می‌شوند که حداقل نیمی از این آمار را می‌توان با کمک مشاوره ژنتیک کنترل کرد (۱۰)؛ بنابراین مطالعه ژنتیکی لوکوس‌های اصلی درگیر در ARNSHL به منظور روشن‌سازی نقش هریک از این لوکوس‌ها در جمعیت کشورمان ضروری به نظر می‌رسد. روشن‌سازی اساس ژنتیکی ناشنوایی می‌تواند در آینده، به تشخیص زودهنگام، پیش‌گیری و درمان این بیماری و همچنین ارائه مشاوره ژنتیک دقیق‌تر برای افراد بیمار کمک کند (۵).

اولین بار با تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنوم در یک خانواده ی پاکستانی مبتلا به ARNSHL، لوکوس *DFNB39* که در q۲۱،۱۲-q۱۱،۲۲ قرار دارد، به عنوان لوکوس دخیل در ARNSHL شناسایی شد (۱۱).

در مطالعه‌ای دیگر ۴۱ خانواده ی پاکستانی و هندی خویشاوند مبتلا به ARNSHL با لوکوس *DFNB39* پیوستگی نشان دادند. پس از توالی‌یابی اگزون‌های کد کننده و نواحی غیر کد کننده‌ی ۱۳ ژن موجود در این لوکوس در نهایت ۳ جهش تنظیمی در ژن *HGF* شناسایی شد. در این مطالعه همچنین از دو موش مدل با تنظیم بد یا dysregulation ژن *HGF* استفاده شد که در یکی از آن‌ها، موش ترانس ژن این ژن را در همه ی بافت‌ها به مقدار زیاد بیان می‌کرد و در موش دیگر ژن *HGF* به‌وسیله ی conditional knockout در تعداد محدودی از بافت‌ها از جمله حلقون گوش حذف شده بود. بررسی گوش داخلی در موش‌های ترانس ژن نشان داد که بیان بیش از حد *HGF* با دژنراسیون پیش‌رونده ی سلول‌های مژک‌دار خارجی در حلقون گوش همراه است؛ درحالی‌که حذف *HGF* در حلقون گوش با دیسپلازی عمومی‌تری همراه است (۱۲). ژن *HGF* دارای ۱۷ اینترون و ۱۸ اگزون است. این ژن دارای ۵ ایزوفرم است که در مسیرهای سیگنالینگ بسیار متنوعی در بافت‌های مختلف نقش دارد. طول کامل

ایزوفرم ۱ ژن *HGF* فاکتور رشد هپاتوسیتی را کد می کند که رشد، تحرک و ریختزایی سلولی را پس از اتصال به گیرنده ی خود به وسیله ی فعال سازی یک مسیر تیروزین کینازی، تنظیم می کند (۱۴-۱۲).

در پژوهش حاضر، تجزیه و تحلیل پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB39 در خانواده های مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی در استان خوزستان که برای جهش های موجود در *GJB2* منفی بودند، انجام شد. این مطالعه با هدف بررسی شیوع لوکوس DFNB39 در جمعیت مورد نظر صورت گرفت.

روش بررسی:

در این مطالعه ی مجموعه های بیماران، ۲۵ خانواده ی مبتلا به ARNSHL که دارای حداقل دو بیمار، والدین سالم و ازدواج خویشاوندی بودند از استان خوزستان انتخاب شدند. نمونه گیری خون این افراد پس از تکمیل پرسشنامه و ارزیابی های بالینی و پس از اخذ رضایت نامه کتبی از کلیه افراد شجره نامه انجام شد؛ به گونه ای که از هر فرد به میزان ۵ میلی لیتر خون اخذ شده و با روش فنل کلروفرم DNA ژنومی به صورت استاندارد استخراج و از نظر کمی با دستگاه نانودراپ بررسی شده بود. در این مطالعه جهت بررسی جهش های ژن *GJB2* برای هر دو

اگزون این ژن، در همه ی ۲۵ خانواده ی مورد مطالعه، توالی یابی انجام شد که در نهایت ۳ خانواده دارای جهش در ژن *GJB2* بودند و از مطالعه حذف شدند و تنها خانواده های فاقد جهش در ژن *GJB2* در این مطالعه وارد شدند.

انتخاب نشانگرها، تعیین ژنوتیپ و بررسی پیوستگی ژنتیکی از طریق تجزیه و تحلیل پیوستگی وجود ارتباط بین ناشنوایی و لوکوس DFNB39 بررسی شد. انتخاب نشانگرهای (Short Tandem Repeat= STR) مناسب از طریق پایگاه های اطلاعاتی NCBI map viewer و انتخاب پرایمرهای لازم جهت تکثیر این نشانگرها توسط NCBI UniSTS صورت گرفت. وجود محدوده تغییرات در طول محصول PCR و دارا بودن کمترین میزان باندهای ثانویه یا stutter band هتروزیگوسیتی بالا و وجود هتروزیگوت بودن پدر و مادر برای یک نشانگر معین، از جمله معیارهای مهم انتخاب نشانگرها در مطالعات پیوستگی ژنتیکی می باشد. ویژگی های مربوط به نشانگرهای لوکوس DFNB39 در جدول شماره ۱ ذکر شده است. در صورت معنی دار نبودن (Uninformative) نشانگرها در هر یک از خانواده های مورد مطالعه از نشانگرهای دیگری در محل لوکوس مورد نظر استفاده شد.

جدول شماره ۱: نشانگرهای لوکوس DFNB39

نام نشانگر	آغازگر رفت (۵' - ۳')	آغازگر برگشت (۳' - ۵')	اندازه محصول (bp)	هتروزیگوسیتی
D7S2443	CTTATGTCATTTTATGTGTTAATCA	AATAGGGGTTTCATTTTATCC	۱۴۳	٪۷۹
D7S2212	AGATCCATATAGGTACATATCCAAA	GAACCTCTCACCCCATCCTTT	۲۲۰	٪۷۳
D7S804	GAAATGGTAAAAATCCTCCTC	ACTATGTGTGTCTATGTGCG	۸۹	٪۶۶
D7S820	CTGAGGTATCAAAAACTCAGAGG	TGTCATAGTTTAGAACGAACCTAACG	۲۲۶	٪۸۳
D7S634	CTCAGTACACGTTGCTGGTA	AATCCTCCAAATGAAACAGA	۱۳۶	٪۷۸
D7S802	GGGTTTCCTTTTGTAGAGGACT	TGCAGAGAAACCTTGTGAGAT	۱۷۰	٪۸۱

برای تکثیر نشانگرها از روش PCR touchdown

استفاده شد، به این صورت که در چند سیکل شروع PCR دمای Annealing از چند درجه بالاتر شروع می شود تا پرایمرها اختصاصی تر به محل مورد نظر در ژن اتصال پیدا کنند و سپس PCR در دمای واقعی Annealing ادامه می یابد. برنامه حرارتی برای تکثیر نشانگرها به این صورت بود. 95°C به مدت ۵ دقیقه، ۸ سیکل touchdown شامل 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ تا 48°C درجه به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۲۷ سیکل بعدی شامل 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، 47°C به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۳۰ ثانیه که با ۵ دقیقه سنتز نهایی در 72°C پایان یافت. در هر واکنش PCR، 0.5 میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (10PM) (شرکت سازنده TAGC دانمارک، شرکت وارد کننده ژن فن آوران ایران)، 2.5 میکرولیتر از $10\times$ PCRbuffer (شرکت سازنده KBC ایران)، 0.5 میکرولیتر dNTP mix (10Mm) (شرکت سازنده KBC ایران)، یک میکرولیتر از 50mM MgCl_2 (شرکت سازنده KBC ایران)، 0.1 میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمرز (5unit/ μl) (شرکت سازنده KBC ایران) و $1/5$ میکرولیتر از DNA ژنومیک استفاده شد که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. قطعات تکثیر شده به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) بر روی ژل پلی اکریل آمید (شرکت سازنده Merck آلمان، شرکت وارد کننده یاهو طب ایران) 8% تا 12% ، با جریان ۴۰ میلی آمپر به مدت ۴-۵ ساعت الکتروفورز شد و سپس با نیترا نقره رنگ آمیزی و باندها رویت گردید. هموزیگوت بودن نشانگرها در افراد بیمار نشانه ی وجود پیوستگی می باشد و در افراد سالم و آنهایی که پیوستگی نشان نمی دهند، به صورت هتروزیگوت می باشد. ژل پلی اکریل آمید پلیمری از مونومرهای اکریل آمید است که توسط مواد پلیمریزه کننده (بیس اکریل آمید) حاصل می شود. معمولاً پلیمریزاسیون به وسیله آمونیوم پرسولفات (APS) انجام می شود. ژل به

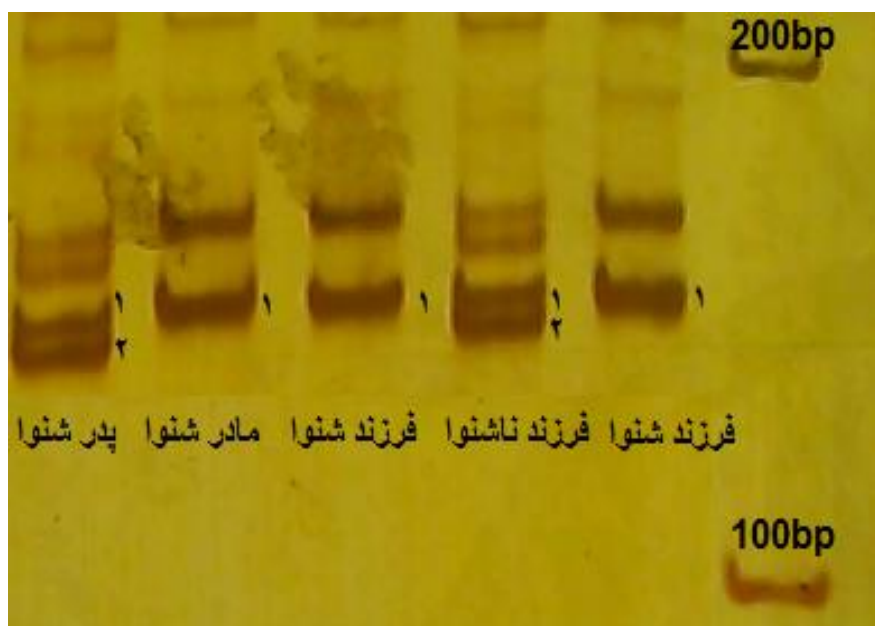
وسیله تترا متیل اتیل دی آمین (TEMED) پایدار می شود. اندازه منافذ، به وسیله غلظت اکریل آمید در واکنش تعیین می شود. قدرت این نوع ژل فوق العاده زیاد است و قطعات DNA را که دارای اختلاف طول به کوچکی یک جفت باز هستند می تواند تفکیک نماید. ژل های پلی اکریل آمید در وضعیت عمودی و در یک جریان الکتریکی ثابت قرار می گیرند.

برای محاسبه ی SLink از FastSlink version 2.51

و برای محاسبه ی نمره ی LOD (LOD score) پارامتری دو نقطه ای و چند نقطه ای به ترتیب از Superlink version 1.6 و Simwalk version 2.91 استفاده شد (۱۷-۱۵). از نرم افزار GeneHunter برای محاسبه امتیاز LOD پارامتری چند نقطه ای استفاده شد (۱۸). رسم هاپلوتا پ (مجموعه ی ژنوتیپ نشانگرهای مجاور) در مورد خانواده های مشکوک به پیوستگی با کمک نرم افزار HaploPainter 2.95 version صورت گرفت. این مرحله به منظور تأیید یا رد پیوستگی استفاده می شود (۱۹).

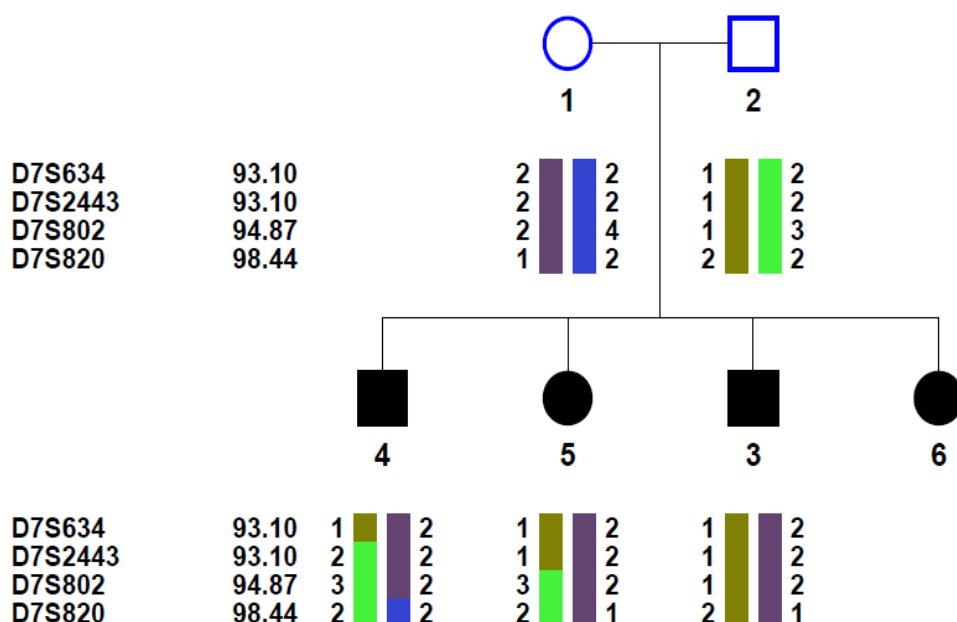
یافته ها:

۸۴٪ افراد مورد مطالعه در جمعیت مورد بررسی، ناشنوایی دوطرفه ی حسی-عصبی شدید تا عمیق داشتند. در ۸۰٪ خانواده های مورد بررسی سه نسل ازدواج خویشاوندی دیده شد و با توجه به داده های ارتباط با شجره نامه، غیر سندر می بودن ناشنوایی و الگوی توارث مغلوب اتوزومی مورد تأیید بود. ارزش SLINK این خانواده ها بین ۲ تا ۷ برآورد شده است. در ۲۵ خانواده مورد مطالعه پس از بررسی الگوی نشانگرهای لوکوس DFNB39 و با تکرار دوبار یا بیشتر الکتروفورز بر روی ژل (پلی اکریل آمید) برای تمامی خانواده ها پیوستگی رد شد. تصویر شماره ۱، جهت تأیید نتایج حاصل از ژل ها، همان طور که در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است، هاپلوتا پ خانواده ها نیز رسم شد که در نهایت در تمامی خانواده ها عدم پیوستگی به لوکوس DFNB39 تأیید شد.



تصویر شماره ۱: نتیجه بررسی تکثیر نشانگر D7S2443 بر روی ژل پلی آکریل آمید

شماره‌های ۱ و ۲ هر کدام بیانگر یک آلل است. فرد بیمار الگوی هتروزیگوت (۱ و ۲) را نشان داد. در صورت پیوستگی افراد سالم حامل ژن به صورت هتروزیگوت و تمام افراد بیمار به صورت هموزیگوت می‌باشند.



تصویر شماره ۲: یک هاپلوتاایپ مربوط به عدم پیوستگی در یکی از خانواده‌های مورد بررسی

در صورت پیوستگی الگوی هاپلوتاایپ بیماران باید به صورت دو آلل یکسان باشد. در این شجره‌نامه بیماران هاپلوتاایپ یکسانی ندارند و پیوستگی به لوکوس DFNB39 رد می‌شود. نقشه ژنتیکی نشانگرها بر اساس مارشفیلد می‌باشد.

بحث:

در این مطالعه ۲۵ خانواده با حداقل دو فرد ناشنوا از استان خوزستان از نظر پیوستگی به لوکوس DFN39 بررسی شدند. هدف مطالعه تعیین شیوع این لوکوس در خانواده‌های مورد بررسی بود. در این مطالعه هیچ‌یک از خانواده‌ها به لوکوس مورد بررسی پیوستگی نشان ندادند. لوکوس DFN39 توسط Wajid و همکاران پس از انجام آنالیز پیوستگی برای ۵۰ نشانگر در یک خانواده پاکستانی خویشاوند و مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی کشف شد (۱۱). نیز در مطالعه‌ی Schultz و همکاران، ۴۱ خانواده‌ی پاکستانی و هندی خویشاوند مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی با لوکوس DFN39 پیوستگی نشان دادند. آن‌ها سپس در ۱۱ خانواده از این ۴۱ خانواده اگرزهای کدکننده‌ی ۱۳ ژن موجود در این لوکوس را توالی‌یابی کردند که هیچ‌گونه جهش بد معنی، بی‌معنی و تغییر چارچوبی را مشاهده نکردند. سرانجام پس از توالی‌یابی نواحی غیر کدکننده‌ی این ژن‌ها در نهایت ۳ جهش تنظیمی را در اینترون ۴ و اگرز ۵ ژن *HGF* شناسایی کردند. در افراد مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی ۳۶ خانواده‌ی پاکستانی و ۲ خانواده‌ی هندی برای یک حذف شدگی ۳bp ($c.482+1986-1988\text{delITGA}$) درون اینترون ۴ ژن *HGF* هموزیگوسیتی مشخص شد. این جهش در یک ناحیه بسیار حفاظت شده که قسمتی از ناحیه‌ی ترجمه نشدنی ۳' است و به‌عنوان یک ایزوفرم کوتاه ژن *HGF* معین شده بود، رخ می‌دهد که این جهش به رمز درآوردن ۲۴ آمینواسید اضافی قبل از مواجهه با کدون پایان را پیش‌بینی می‌کند. آن‌ها همچنین در اعضای مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی ۲ خانواده‌ی پاکستانی برای یک حذف شدگی ۱۰bp ($c.482+1991-2000\text{del GATGATGAAA}$) در اینترون ۴ ژن *HGF* هموزیگوسیتی مشاهده کردند. این جهش نیز در ناحیه‌ای که حذف ۳bp رخ می‌دهد، صورت می‌گیرد.

این جهش نیز کد شدن ۲۴ آمینواسید اضافی را قبل از کدون پایان پیش‌بینی می‌کند. در این مطالعه همچنین در سه عضو از یک خانواده‌ی پاکستانی مبتلا، برای یک جهش جانشینی هم‌معنی ($c.495G>A$ [p.S165S]) در اگرز ۵ ژن *HGF* هموزیگوسیتی مشاهده کردند. این جهش سبب تبدیل کدون آمینواسید سرین در کدون ۱۶۵ به کدونی دیگر از همین آمینواسید می‌شود. این جانشینی ۱۳ نوکلئونید درون اگرز ۵ نسبت به جایگاه پذیرنده‌ی پیرایش مربوط به ایزوفرم ۱ ژن *HGF* اتفاق می‌افتد؛ در حالی که همچنین در موقعیت ۳ نسبت به جایگاه پذیرنده‌ی پیرایش مربوط به ایزوفرم ۳ این ژن رخ می‌دهد که این مسئله تغییر طول نسبی دو جایگاه پیرایش را پیش‌بینی می‌کند (۱۲).

این محققان در حقیقت یک ناحیه‌ی موثر ۱,۲Mb هم‌پوشان معین کردند که درون لوکوس DFN39، ۱۷,۶ Mb، اصلی قرار داشت (۱۱، ۱۲). در مطالعه‌ی همچنین، دو ایزوفرم کوتاه ژن *HGF* را شناسایی کردند که شامل اگرزهای ۱ تا ۴ و یک ناحیه‌ی ترجمه نشدنی ۳' در اینترون ۴ می‌باشند. طول کامل ایزوفرم ۱ ژن *HGF* یک پلی‌پپتید غیرفعال را کد می‌کند که به‌وسیله‌ی سرین پروتئازها به دو زنجیره‌ی آلفا ۶۹-kDa و بتا ۳۴-kDa برش می‌خورد که یک باند دی‌سولفیدی بین دو زنجیره آلفا و بتا مولکول فعال هترومریک را تولید می‌کند. این مولکول فاکتور رشد هپاتوسیتی نام دارد. فاکتور رشد هپاتوسیتی یک سایتوکاین پلئوتروپیک است که فعالیت‌های میتوژنی، موتوژنی و مورفوژنیک را در سلول‌های متفاوتی از جمله سلول‌های عصبی انجام می‌دهد (۱۴-۱۲).

مطالعه‌ای در ۱۰۰ خانواده‌ی ایرانی مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی انجام شد که در طی این مطالعه با استفاده از STRهای D7S804، D7S806 و D7S807 یک خانواده به لوکوس DFN39 پیوستگی نشان داد (۲۰).

پیشرفت غربالگری ناشنوایی در جمعیت‌های ایرانی و در ادامه مشاوره ژنتیک اصولی سهیم باشند.

نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج این مطالعه، لوکوس DFNB39 احتمالاً نقش کمی در ایجاد ناشنوایی در جمعیت بررسی شده دارد و دلیل اصلی ناشنوایی در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند مربوط به سایر لوکوس‌های درگیر در ناشنوایی باشد. با این حال برای تعیین نقش دقیق‌تر این لوکوس‌ها در کشورمان به مطالعات بیشتر و تعداد خانواده‌های بیشتر نیاز است.

تشکر و قدردانی:

با تشکر فراوان از بیماران ناشنوا و خانواده‌های ایشان که در انجام این پروژه ما را یاری رساندند. این مقاله مربوط به نتایج پایان‌نامه نویسنده نفر اول می‌باشد. از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با شماره گرنت ۱۷۶۴ جهت تأمین بودجه و همچنین از کارکنان مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که ما را در این پژوهش یاری نمودند، کمال تقدیر و تشکر دارم.

به‌طور خلاصه، در مطالعات پیشین تعداد اندکی از خانواده‌ها در جهان و تنها یک خانواده در ایران به لوکوس DFNB39 پیوستگی نشان داد. در مطالعه حاضر لوکوس DFNB39 در خانواده‌های مورد بررسی پیوستگی نشان نداد که این مسئله می‌تواند ناشی از هتروژنیتی بالای بیماری ناشنوایی باشد و احتمالاً لوکوس‌های دیگر دخیل در ناشنوایی در جمعیت مورد مطالعه‌ی این پژوهش، در ایجاد ناشنوایی مبتلایان نقش دارد. این مطالعه نشان می‌دهد که احتمالاً این لوکوس در جمعیت ایرانی نقش کمی در بروز ناشنوایی دارد. البته با توجه به این که تاکنون در ایران و سایر نقاط جهان درباره‌ی این لوکوس مطالعات اندکی صورت گرفته، بررسی بیشتر این لوکوس در جمعیت‌هایی با منشاء نژادی و جغرافیایی متفاوت، ضروری به نظر می‌رسد. چنین مطالعاتی سبب افزایش دانش ما در زمینه‌ی تعیین نقش این لوکوس در سیستم شنوایی و شناسایی فرایندهای مولکولی درگیر در آن می‌شود. به‌علاوه، این مطالعات دانش ما در زمینه‌ی چگونگی تغییر این فرایندها و ایجاد نقص در سیستم شنوایی به‌وسیله‌ی این تغییرات را بهبود می‌بخشد. چنین مطالعاتی می‌تواند به‌طور چشمگیری در

منابع:

1. Practice P, Committee G. American College of Medical Genetics and Genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss. *Genet Med*. 2014; 16(4): 347-55.
2. Vozzi D, Morgan A, Vuckovic D, D'Eustacchio A, Abdulhadi K, Rubinato E, et al. Hereditary hearing loss: A 96 gene targeted sequencing protocol reveals novel alleles in a series of Italian and Qatari patients. *Gene*. 2014; 542(2): 209-16.
3. Atik T, Bademci G, Diaz-Horta O, Blanton SH, Tekin M. Whole-exome sequencing and its impact in hereditary hearing loss. *Genet Res*. 2015; 97: e4.
4. Atik T, Onay H, Aykut A, Bademci G, Kirazli T, Tekin M, et al. Comprehensive analysis of deafness genes in families with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *PLoS One*. 2015; 10(11): e0142154.
5. Diaz-Horta O, Duman D, Foster II J, Sirmacı A, Gonzalez M, Mahdih N, et al. Whole-exome sequencing efficiently detects rare mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *PloS one*. 2012; 7(11): e50628.
6. Saadat M, Ansari-Lari M, Farhud D. Short report consanguineous marriage in Iran. *Ann Hum Biol*. 2004; 31(2): 263-9.

7. Chaleshtori MH, Farhud D, Patton M. Congratulation to margaret chan familial and sporadic *GJB2*-Related Deafness in Iran: Review of Gene Mutations. Iran J Public Health. 2007; 36(1): 1-14.
8. Najmabadi H, Nishimura C, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, Malekpour M, Daneshi A, et al. *GJB2* mutations: passage through Iran. Am J Med Genet A. 2005; 133(2): 132-7.
9. Mahdieh N, Rabbani B, Shirkavand A, Bagherian H, Movahed ZS, Fouladi P, et al. Impact of consanguineous marriages in *GJB2*-related hearing loss in the Iranian population: A report of a novel variant. Genet Test Mol Biomarkers. 2011; 15(7-8): 489-93.
10. Mahdieh N, Rabbani B, Wiley S, Akbari MT, Zeinali S. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss in Iran in comparison with other populations. J Hum Genet. 2010; 55(10): 639-48.
11. Wajid M, Abbasi AA, Ansar M, Pham TL, Yan K, Haque S, et al. DFNB39, a recessive form of sensorineural hearing impairment, maps to chromosome 7q11. 22-q21. 12. Eur J Hum Genet. 2003; 11(10): 812.
12. Schultz JM, Khan SN, Ahmed ZM, Riazuddin S, Waryah AM, Chhatre D, et al. Noncoding mutations of *HGF* are associated with nonsyndromic hearing loss, DFNB39. Am J Hum Genet. 2009; 85(1): 25-39.
13. Mizuno K, Nakamura T. Molecular characteristics of *HGF* and the gene, and its biochemical aspects. Exs. 1993; 65: 1-29.
14. Nakamura T, Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (*HGF*) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. Proceedings of the Japan Academy, Series B. 2010; 86(6): 588-610.
15. Fishelson M, Geiger D. Exact genetic linkage computations for general pedigrees. Bioinformatics. 2002; 18(suppl_1): S189-S98.
16. Ott J. Computer-simulation methods in human linkage analysis. Proc Natl Acad Sci. 1989; 86(11): 4175-8.
17. Sobel E, Sengul H, Weeks DE. Multipoint estimation of identity-by-descent probabilities at arbitrary positions among marker loci on general pedigrees. Hum Hered. 2001; 52(3): 121-31.
18. Silberstein M, Weissbrod O, Otten L, Tzemach A, Anisenia A, Shtark O, et al. A system for exact and approximate genetic linkage analysis of SNP data in large pedigrees. Bioinformatics. 2012; 29(2): 197-205.
19. Tabatabaiefar M, Alasti F, Shariati L, Farrokhi E, Fransen E, Nooridalooi M, et al. DFNB93, a novel locus for autosomal recessive moderate-to-severe hearing impairment. Clin Genet. 2011; 79(6): 594-8.
20. Babanejad M, Fattahi Z, Bazazzadegan N, Nishimura C, Meyer N, Nikzat N, et al. A comprehensive study to determine heterogeneity of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in Iran. Am J Med Genet A. 2012; 158(10): 2485-92.

Genetic linkage analysis of DFNB39 locus in families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) from Khuzestan province

Zarepour N¹, Tabatabaiefar MA², Taghipour A¹, Nemati F¹, Sadeghian L¹, Hashemzadeh Chaleshtori M^{3*}

¹Student, Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, I.R. Iran; ²Genetics and Molecular Biology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; ³Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 11/Jun/2016 Accepted: 8/Dec/2016

Background and aims: Hearing loss (HL) is a most common sensory deficit in humans and approximately one in 1,000 newborns has severe-to-profound HL. About 50% of HL cases are inherited and approximately 70 percent of HL cases are Non-syndromic that about 80 percent of this type of HL is inherited in recessive manner (ARNSHL). This is a heterogeneous disease and its prevalence is higher in developing countries. In Iran due to high rate of consanguinity has high frequency, too. The purpose of the present study was to investigate genetic linkage analysis of DFNB39 locus in families with autosomal recessive nonsyndromic HL from Khuzestan province.

Methods: In this descriptive laboratory study, to determine type and frequency of *HGF* mutations 300 individuals of 25 families from Khuzestan province with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss were examined. Selected families in this study had consanguinity and had at least 2 patients and also they were negative for *GJB2* gene mutations. Linkage analysis was performed by 6 markers STR (Short tandem repeats) which were located in or were tightly linked to DFNB39 locus conventional PCR and PAGE.

Results: After examining different families, it was revealed non of the families did not show linkage to the DFNB39 locus. Lack of *HGF* gene mutations in mentioned family suggests that the *HGF*'s mutations probably have no role in causing HL in the studied families.

Conclusion: Based on the results of this study, DFNB39 locus may not be important role in causing hearing loss of population studied. However, further studies are necessary to determine more precisely the role of this locus in hearing loss in Iranian population.

Keywords: DFNB39 locus, *HGF* gene, Autosomal recessive nonsyndromic hearing loss.

Cite this article as: Zarepour N, Tabatabaiefar MA, Taghipour A, Nemati F, Sadeghian L, Hashemzadeh Chaleshtori M. Genetic linkage analysis of DFNB39 locus in families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) from Khuzestan province. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 19(3): 76-84.

***Corresponding author:**

Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00983833331471, E-mail: mchalesh@yahoo.com